

Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir



Research Article
Vol. 19, No. 5, Dec.-Jan. 2023, p. 693-709

The Effect of Ultrasound Pretreatment on Hydrolysis Time by Pepsin Enzyme to Produce Antioxidant Peptides from Edible Mushroom (*Agaricus bisporus*) Protein

I. Izanloo[1], A.R. Sadeghi Mahoonak[2*]

1 and 2- M.Sc. Student and Professor, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: sadeghiaz@gau.ac.ir)

Received: 2022.10.20 Revised: 2023.03.02 Accepted: 2023.04.29 Available Online: 2023.04.29	**How to cite this article:** Izanloo, I., & Sadeghi Mahoonak, A.R. (2023). The effect of ultrasound pretreatment on hydrolysis time by pepsin enzyme to produce antioxidant peptides from edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *19*(5), 693-709. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78786.1203

Introduction

Free radicals originate from oxidation reactions decrease food quality and also promote incidence of various diseases such as cancer. In this regard, the use of natural compounds with antioxidant properties, such as bioactive peptides, is of interest to many researchers. Food-derived bioactive peptides, can play an important role in the oxidative systems. Ultrasound, as a cheap and green technology, is widely used to extract proteins and antioxidant compounds. Ultrasound pretreatment before enzymatic hydrolysis can open the protein structure and increase the intensity of proteolysis by increasing the exposure of peptide bonds prone to enzymatic hydrolysis; which increases the production efficiency of bioactive peptides. Ultrasound treatment changes the three-dimensional structure of proteins. Therefore, a combination of pretreatment with ultrasound and sequential enzymatic hydrolysis can be a promising way to modify the function of proteins.

Materials and Methods

In this research the effect of hydrolysis time and ultrasonic pretreatment on enzymatic hydrolysis of edible mushroom protein by pancreatic enzyme to produce peptides with high antioxidant capacity was evaluated. First edible mushroom was turned into powder and then, in order to optimize the production of hydrolyzed proteins with maximum antioxidant activity, the hydrolysis was performed 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 minutes with a ratio of enzyme to substrate of 1% (based on the result of previous research) and at 40°C in four conditions (1- without ultrasound pre-treatment, 2- with ultrasound pre-treatment with 40% power, 3- with ultrasound pre-treatment with 70% power and 4- with ultrasound pre-treatment with 100% power) by ultrasound probe in 5 minutes before adding the enzyme. In the next step, the antioxidant capacity of hydrolyzed proteins was measured at different times by DPPH free radical scavenging activity, iron ion reduction power, iron ion chelation and total antioxidant capacity.

Results

The results showed that the highest DPPH free radical scavenging activity in untreated and treated samples with 40, 70 and 100% ultrasound power were 69.1, 77.45, 79.07 and 80.27, respectively. In most of the hydrolysis times, DPPH free radical scavenging activity in ultrasound treatment with 100% power was higher than the samples treated with 40 and 70% power. The highest total antioxidant capacity in untreated and treated samples with 40, 70 and 100% ultrasound power were 0.871, 1.025, 1.05 and 1.2 (absorption at 695 nm), respectively. In most of the hydrolysis times, the total antioxidant capacity in the samples treated with ultrasound with 100% power was higher than the samples treated with

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78786.1203

40 and 70% power. The results showed that the highest reducing power of Fe^{3+} in untreated and treated samples with 40, 70 and 100% ultrasound power were 2.03, 2.40, 2.44 and 2.51(absorption at 700 nm), respectively. The highest iron ion chelation power in untreated and treated samples with 40, 70 and 100% ultrasound power were 25.22, 30.40, 26.52 and 41.10%, respectively. By increasing the ultrasound power in most of the hydrolysis times, the chelating power of iron ions in the ultrasound treatment with 100% power was higher than the samples pretreated with 40 and 70% power. The results showed that samples pretreated with 100% power ultrasound have the highest antioxidant properties compared to samples without pretreatment and pretreated with 40% and 70% ultrasound power. Based on the results, using ultrasound treatment with 100% power and during hydrolysis time of 60 minutes, a product with high antioxidant capacity was obtained and selected as a suitable treatment.

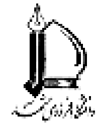
Conclusion

The ultrasonic mechanism is attributed to its thermal effects, cavitation and mechanical efficiency, so that it can increase the mass transfer and increase the contact between the substrate and the enzyme or change the spatial structure of the substrate. The results showed that samples pretreated with ultrasound with 100% power have the highest antioxidant properties compared to samples without pretreatment and pretreated with 40 and 70% power. Therefore, the use of high-power ultrasonic pretreatment shortens the hydrolysis time to achieve peptides with higher antioxidant capacity and thus increases the efficiency of enzymatic hydrolysis.

Keywords: Antioxidant properties, Bioactive peptides, Mushroom powder, Pretreatment, Protein



نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir



مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- آذر ۱۴۰۲ ص. ۷۰۹-۶۹۳

تأثیر پیش‌تیمار فراصوت بر زمان هیدرولیز به وسیله آنزیم پپسین جهت تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از پروتئین قارچ‌خوراکی (*Agaricus bisporus*)

آیسان ایزانلو[۱] - علیرضا صادقی ماهونک[۲]*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۹

چکیده

پپتیدهای زیست‌فعال در واقع بخش‌های پروتئینی خاصی هستند که علاوه بر ارزش غذایی، تأثیرات مثبتی برعملکرد بدن دارند. فراصوت، به‌عنوان یک فناوری سبز، و ارزان، به‌طور گسترده‌ای برای استخراج پروتئین و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود. تیمار با فراصوت باعث تغییر ساختار سه بعدی پروتئین‌ها می‌شود. در نتیجه، ترکیبی از پیش‌تیمار با فراصوت و هیدرولیز آنزیمی می‌تواند راهی امیدوارکننده برای اصلاح عملکرد پروتئین‌ها باشد. هدف از این پژوهش بررسی اثر زمان هیدرولیز و همچنین تأثیر پیش‌تیمار فراصوت بر هیدرولیز آنزیمی پروتئین قارچ دکمه‌ای به‌وسیله آنزیم پپسین جهت تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌باشد. جهت انجام پژوهش ابتدا قارچ به پودر تبدیل و سپس عمل هیدرولیز در زمان‌های۳۰-۲۱۰ دقیقه با نسبت به آنزیم به سوبسترا ۱٪ (وزنی/وزنی نسبت به وزن سوبسترای پروتئینی) و در دمای ۴۰درجه‌سانتی‌گراد در چهار وضعیت بدون و با پیش‌تیمار فراصوت با توان ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰٪ صورت گرفت. افزایش توان تیمار فراصوت باعث افزایش قابلیت مهار رادیکال‌آزاد DPPH، فعالیت شلاته کنندگی یون آهن، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و قدرت احیاکنندگی یون آهن در زمان‌های هیدرولیز کوتاه‌تر گردید. نتایج نشان داد، نمونه‌های پیش‌تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ نسبت به نمونه‌های بدون پیش‌تیمار و پیش‌تیمار شده با توان۴۰ و ۷۰٪ بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را دارا می‌باشند. بنابراین استفاده از پیش‌تیمار فراصوت با توان بالا موجب کوتاه نمودن زمان هیدرولیز جهت دستیابی به پپتیدهای با قابلیت آنتی-اکسیدانی بالاتر و افزایش کارآیی هیدرولیز آنزیمی می‌گردد. براساس نتایج تیمار فراصوت با توان۱۰۰٪ و طی زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه موجب دستیابی محصولی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالا می‌گردد و به‌عنوان تیمارمناسب انتخاب گردید.

واژه‌های کلیدی: پپتیدهای زیست‌فعال، پروتئین، پودر قارچ، پیش‌تیمار، ویژگی آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

به منظور پیشگیری از فساد غذاها و محافظت بدن در مقابل بسیاری از بیماری‌ها ضروری است از پراکسیداسیون چربی‌ها و تشکیل رادیکال‌های آزاد به‌وجود آمده در فرآورده‌های غذایی و سلول‌های زنده جلوگیری شود. بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به‌عنوان افزودنی غذایی جهت جلوگیری از کاهش کیفیت غذا به‌کار برده می‌شوند که در ارتباط با ایمنی و جنبه‌های وابسته به سلامتی آن‌ها نگرانی‌هایی وجود دارد. از این رو پیشرفت در استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌منظور جایگزینی با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مورد توجه پژوهشگران می باشد (Vioque *et al.*, 2001). آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند BHA[۳]، BHT[۴]، PG[۵] و TBHQ[۶] به‌دلیل نگرانی‌های مرتبط با عوارض نامطلوب آن‌ها بر سلامت انسان، تحت کنترل و نظارت شدید

---

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
(*- نویسنده مسئول: (Email: sadeghiaz@gau.ac.ir

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78786.1203

3- butylated hydroxyanisole
4- butylatedhydroxytoluene
5- propyl gallate
6- Tertiary butylhydroquinone

هستند. در سال‌های اخیر، افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان در ارتباط بین سلامت و رژیم غذایی موجب افزایش تقاضا برای غذاهای فراسودمند شده است (FitzGerald and Meisel, 2000). پپتیدهای زیست‌فعال توالی‌هایی با ۲۰-۳ اسیدآمینه هستند که از شکسته‌شدن پروتئین به پپتیدهای کوچک و آمینواسیدهای آزاد تشکیل می‌شوند (Nourmohammadi *et al.*, 2017). پپتیدهای زیست‌فعال در واقع بخش‌های پروتئینی خاصی هستند که علاوه بر ارزش غذایی، تأثیرات مثبتی برعملکرد بدن و شرایطی دارند که منجر به اثرگذاری بر سلامتی می‌شود. البته پپتیدهای زیست‌فعال درساختار پروتئین والد به شکل غیرفعال هستند و زمانی که به‌صورت توالی پپتیدی آزاد می‌شوند، می‌توانند اثرات سلامتی‌بخش خود را بروز دهند (Bhat *et al.*, 2015). رایج‌ترین روش تولید پپتیدهای فعال زیستی از طریق هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها است. اکثر پپتیدهای فعال زیستی شناخته شده با استفاده از آنزیم‌های دستگاه‌گوارش، معمولاً پپسین و تریپسین تولید شده‌اند. در زمینه تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده تحقیقات زیادی انجام شده است. فرآیندهای هیدرولیز آنزیمی دارای معایبی از جمله کارایی پایین آنزیم، زمان طولانی فرایند آنزیمی و نرخ پایین تبدیل سوبسترا به محصول می‌باشند (Zhou *et al.*, 2017). درنتیجه امروزه از روش‌های مختلف نظیرامواج فراصوت، مایکروویو، انجماد، فرایند فشار بالا، و غیره برای پیش‌تیمار پروتئین و رفع مشکلات فوق استفاده می‌شود (Li *et al.*, 2017) فراصوت، به‌عنوان یک فناوری سبز، و ارزان، به‌طور گسترده‌ای برای استخراج پروتئین و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود (Wen *et al.*, 2018). علاوه بر این، فرایند فراصوت تأثیری برروی ساختار اولیه پروتئین ندارد با این حال موجب تغییر در ساختار سوم و چهارم پروتئین می‌گردد که این امر در ویژگی‌های عملکردی و زیست‌فعالی آن تاثیرگذار است (Walters, 2019). پیش‌تیمار فراصوت قبل از هیدرولیز آنزیمی می‌تواند باعث باز شدن ساختار پروتئین و افزایش شدت پروتئولیز از طریق افزایش در معرض قرارگیری باندهای پپتیدی مستعد به هیدرولیز آنزیمی گردد؛ این امر باعث افزایش کارایی تولید پپتیدهای زیست‌فعال می‌گردد (Kadam *et al.*, 2015). تیمار با فراصوت باعث تغییر ساختار سه بعدی پروتئین‌ها می‌شود. در نتیجه، ترکیبی از پیش‌تیمار با فراصوت و هیدرولیز آنزیمی متوالی می‌تواند راهی امیدوارکننده برای اصلاح عملکرد پروتئین‌ها باشد (Chen *et al.*, 2011).

پن و همکاران (Pan *et al.*, 2016)، گزارش کردند که افزایش مدت زمان فعالیت آنزیم، منجر به افزایش رهاسازی پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی می‌شود، که این پپتیدها می‌توانند رادیکال های آزاد را به ترکیباتی پایدار تبدیل کنند، در نتیجه با افزایش مدت زمان هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها افزایش یافته است.

قارچ به‌عنوان یکی از قدیمی‌ترین موادغذایی با ارزش‌غذایی مناسب در نظر گرفته می‌شود، و ارزش‌غذایی آن‌ها قابل مقایسه با ماهی و گوشت، می‌باشد. قارچ منبع مناسبی از اسیدهای‌آمینه ضروری متعدد، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، موادمعدنی و غیره است و به‌همین دلیل مصـرف آن رو به افزایش است. یکی از اجزای تغذیه‌ای مهم قارچ پروتئین است، در نتیجه می‌تواند منبع خوبی جهت تولید پپتیدهای زیست‌فعال باشد (Lavi *et al.*, 2012). هدف از این پژوهش بررسی اثر زمان هیدرولیز و همچنین تاثیر پیش‌تیمار فراصوت بر هیدرولیز آنزیمی پروتئین قارچ دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) به‌وسیله آنزیم پپسین جهت تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

پپسین (به‌صورت پودر با فعالیت ۲۵۰ U/mg)، DPPH، پتاسیم فری‌سیانید، فریک‌کلراید، تری‌کلرواستیک‌اسید، آسکوربیک‌اسید از شرکت سیگما، اتانول ۹۶٪، سود، اسیدکلریدریک، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، اسید فسفریک از شرکت مرک و قارچ خوراکی دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) از بازار محلی تهیه شدند.

آماده‌سازی قارچ‌خوراکی

قارچ‌های خریداری شده ابتدا شسته و قطعه قطعه، سپس توسط آب داغ آنزیم‌بری (فرو بردن در آب جوش به مدت ۳ دقیقه و سپس فرو بردن در آب یخ) شدند. سپس در دمای ۸۰ درجه‌سانتی‌گراد در آون تا زمانی که رطوبت آن‌ها به زیر ۱۰ درصد برسد، خشک شدند. در نهایت قارچ‌های خشک شده به کمک آسیاب آزمایشگاهی تبدیل به پودر شدند و پس از عبور از الک با مش ۸۰ در کیسه‌های پلی‌پروپیلنی بسته‌بندی و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شدند (He *et al.*, 2012).

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی با استفاده از روش AOAC انجام شد. برای تعیین میزان پروتئین‌کل در مواد خام اولیه، از دستگاه کلدال (ساخت آلمان، بهر، S3)، میزان خاکستر با استفاده از کوره الکتریکی (ساخت آلمان، نابرترم، FX118-30) استفاده شد و میزان رطوبت با قرار دادن در آون ۱۰۵ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، تعیین شد (Horwitz *et al.*, 1970).

هیدرولیز پروتئین پودر قارچ

جهت انجام هیدرولیز با پپسین از روش (Paisansak *et al.*, 2020)، با کمی تغییرات استفاده شد. ۵۰ گرم پودر قارچ را در بالن حجمی توزین و در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر بافرفسفات (pH=۲) مخلوط گردید. سپس به‌منظور بهینه‌سازی تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، عمل هیدرولیز در طی زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه با نسبت به آنزیم به سوبسترا ۱ درصد (برمبنای آزمون‌های اولیه) و در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد در چهار وضعیت صورت گرفت. حالت اول نمونه بدون پیش‌تیمار فراصوت، حالت دوم همراه با پیش‌تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد، حالت سوم همراه با پیش‌تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد و حالت چهارم همراه با پیش‌تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد توسط پروب فراصوت (توان ۲۰۰ وات و فرکانس ۲۴ کیلوهرتز، مدل UP 200H Ultraschallprozessor) در زمان ۵ دقیقه قبل از افزودن آنزیم انجام گرفت (لازم به ذکراست که انتخاب توان فراصوت بر مبنای آزمون‌های اولیه صورت گرفت). پس از اتمام زمان هیدرولیز به‌منظور غیرفعال کردن آنزیم، محلول پروتئینی تلقیح شده با آنزیم در دمای ۸۵ درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب قرار داده شد تا آنزیم غیرفعال شود. هر تیمار به‌طور جداگانه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد برای مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و سوپرناتانت حاصل با خشک‌کن انجمادی برای به‌دست آوردن پودر پروتئین هیدرولیزشده خشک گردید. سپس پودر حاصل تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله بعد قابلیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده در زمان‌های مختلف توسط روش‌های فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن، شلاته کنندگی یون آهن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل اندازه‌گیری گردید.

آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی

فعالیت مهار رادیکال‌آزاد DPPH از روش چی و همکاران (Chi *et al.*, 2015)، قدرت احیاکنندگی آهن از روش بوگاتوف و همکاران (Bougatef *et al.*, 2009)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل از روش پریتو و همکاران (Dasgupta and De, 2007) و فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن از روش جامدار و همکاران (Jamdar *et al.*, 2010) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش اثر زمان‌های مختلف هیدرولیز (۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه) بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی قارچ خوراکی و همچنین تأثیر پیش‌تیمار فراصوت ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد ارزیابی قرارگرفت. کلیه آزمون‌ها در ۳ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جهت بررسی معنی‌دار بودن متغیر در $P<0.05$ و رسم نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel 2013 انجام گرفت.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی

ترکیبات شیمیایی پودر قارچ در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی پودر قارچ خوراکی

Table 1- Chemical composition of mushroom powder

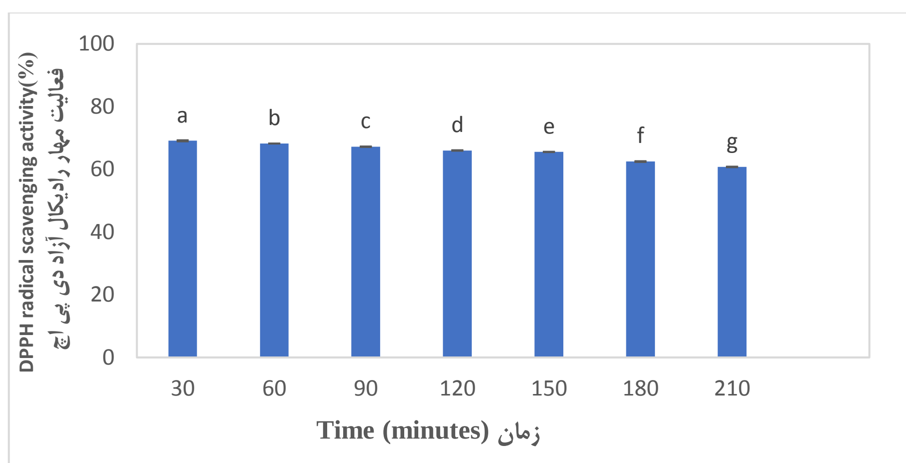
ترکیب شیمیایی Chemical compounds	مقدار Amount
پروتئین (N×۶/۲۵) Protein	26.6 ± 0.17
چربی Fat	3.8 ± 0.15
رطوبت Moisture	6.02 ± 0.52
خاکستر Ash	7.66 ± 0.12
کربوهیدرات (اختلاف از سایر ترکیبات) Carbohydrate by Diff.	55.92 ± 0.15

*اعداد بر مبنای وزن خشک گزارش شدند.
Data reported as dry basis
*میانگین سه تکرار ± انحراف معیار
Three replications ± Mena

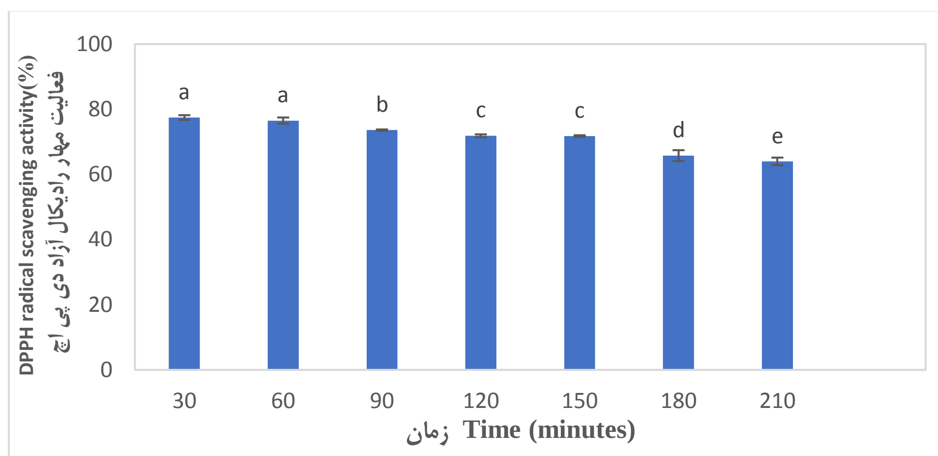
تأثیر زمان هیدرولیز و پیش تیمار فراصوت بر روی مهار رادیکال آزاد DPPH

در شکل ۱ قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار فراصوت (۱الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (۱ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج۱) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د۱) تحت تأثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

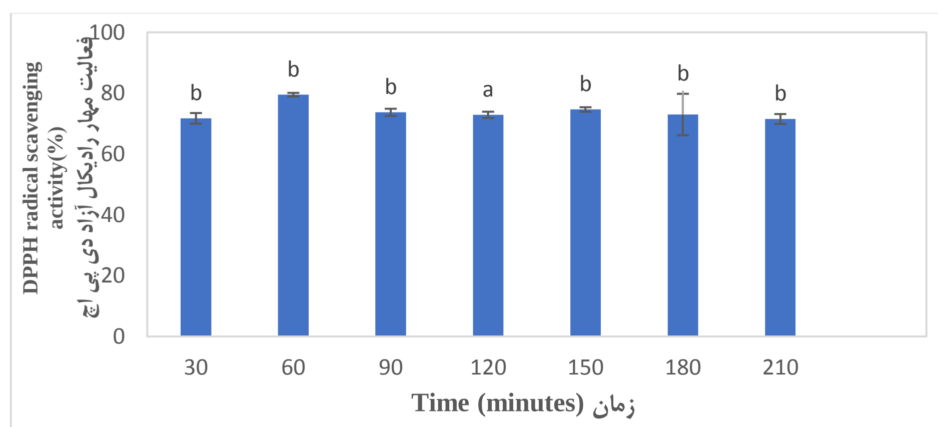
باتوجه به شکل ۱الف بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های تیمارنشده در زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه به‌میزان ۶۹/۱۰ درصد مشاهده گردید. با افزایش زمان هیدرولیز قابلیت مهار رادیکال DPPH کاهش یافت که دلیل این کاهش پیشرفت هیدرولیز و هیدرولیز پپتیدهای با خاصیت آنتی‌اکسیدانی تولیدی در زمان اولیه هیدرولیز می‌باشد.


DPPH radical scavenging activity(%)
فعالیت مهار رادیکال آزاد دی پی اچ
100
80
60
40
20
0
a
b
c
d
e
f
g
30
60
90
120
150
180
210
Time (minutes) زمان

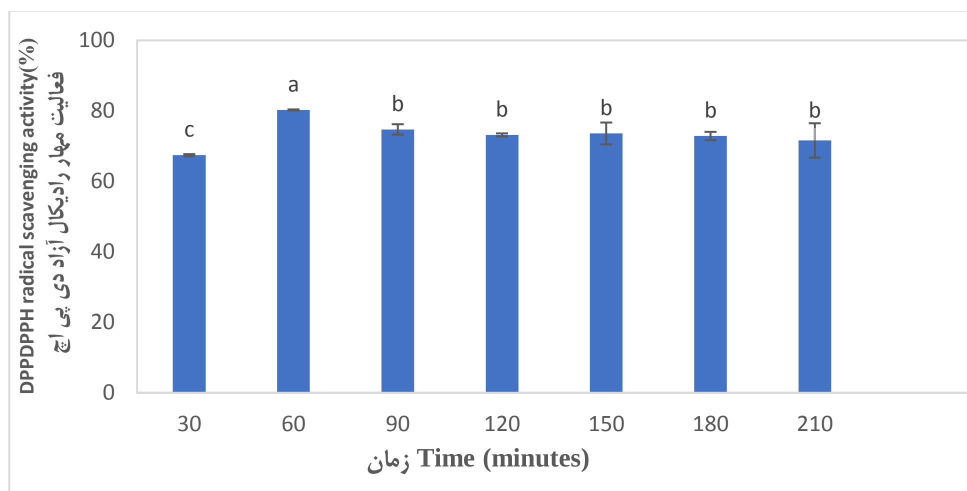
الف a


DPPH radical scavenging activity(%)
فعالیت مهار رادیکال آزاد دی پی اچ
100
80
60
40
20
0
a
a
b
c
c
d
e
30
60
90
120
150
180
210
زمان Time (minutes)

ب b


DPPH radical scavenging activity(%)
فعالیت مهار رادیکال آزاد دی پی اچ
100
80
60
40
20
0
b
b
b
a
b
b
b
30
60
90
120
150
180
210
Time (minutes) زمان

ج c



د d

شکل ۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار فراصوت (۱الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ٤٠ درصد (۱ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (۱ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (۱د) در زمان‌های هیدرولیز مختلف

Figure 1- DPPH radical scavenging activity of hydrolyzed protein samples without ultrasound pretreatment (1a), hydrolyzed protein with 40% ultrasound treatment (1b), hydrolyzed protein with 70% ultrasound treatment (1c) and protein hydrolyzed by ultrasound treatment with 100% power (1d) at different hydrolysis times

مشکین فر و همکاران (Meshginfar *et al.*, 2014)، گزارش کردند که فرایند هیدرولیز باعث رها شدن پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از پروتئین می‌شود اما افزایش زمان هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم منجر به شکستن تعدادی از پپتیدهای آنتی‌اکسیدان تولید شده در مراحل اولیه هیدرولیز می‌گردد در نتیجه از فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH کاسته می‌شود. احتمالا پیشرفت هیدرولیز و تأثیر آنزیم بر پپتیدهای تولید شده در مراحل اولیه منجر به تخریب پپتیدهایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا شده است درنتیجه قابلیت آنتی‌اکسیدانی تولیدی در مراحل بعدی کاهش یافته است. در شکل۱ ب، ج و د به‌ترتیب قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های تیمارشده با فراصوت با توان‌های۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد تحت تأثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ در زمان ۳۰ دقیقه به‌میزان ۷۷/۴۵ درصد مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه‌های تیمارنشده مشخص می‌شود که میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در زمان‌های ابتدایی هیدرولیز در نمونه‌های تیمارشده با فراصوت با توان ۴۰٪ بالاتر از نمونه های تیمار نشده است. به‌طوری‌که مقادیر آن برای نمونه‌های بدون پیش‌تیمار فراصوت و نمونه‌های تیمارشده با فراصوت ۴۰٪ و در زمان های ۳۰ و ۶۰ دقیقه به‌ترتیب (۶۹/۱۰ و ۶۸/۲۲ درصد) و (۷۷/۴۵ و ۷۶/۵۱ درصد) بود. این امر نشان از افزایش قابلیت آنتی‌اکسیدانی نمونه های تیمار شده توسط فراصوت در زمان‌های ابتدایی هیدرولیز بود. همچنین بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های تیمارنشده و تیمارشده توسط فراصوت با توان ۴۰٪ به‌ترتیب ۶۹/۱۰ و ۷۷/۴۵ درصد مشاهده شد که نشان از افزایش قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH تحت تأثیر تیمار فراصوت بود.

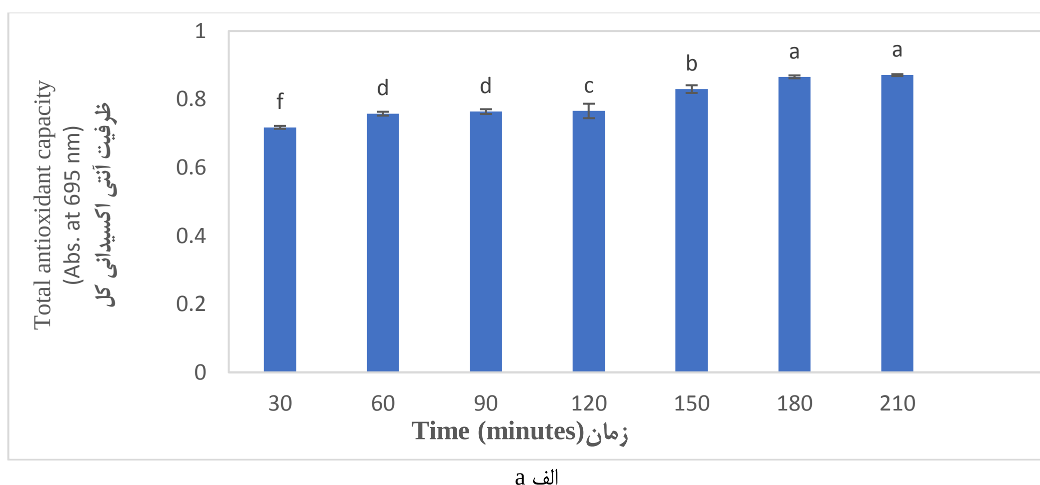
با توجه به شکل ۱ج بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های تیمارشده با فراصوت با توان ۷۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به‌میزان ۷۹/۰۷ درصد مشاهده شد. همچنین بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH درنمونه‌های تیمارشده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به‌میزان ۸۰/۲۷ درصد مشاهده شد. با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، افزایش توان تیمار فراصوت در زمان‌های ابتدایی باعث افزایش قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH گردید. در اغلب زمان‌های هیدرولیز، قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH در تیمار فراصوت باتوان ۱۰۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمارنشده و تیمارشده با فراصوت با توان ۴۰ و ۷۰٪ بود. فراصوت موجب بهبود فعالیت به دام انداختن رادیکال‌های آزاد می‌گردد، که این امر توسط محققین مختلف گزارش شده است (Nadeem *et al.*, 2018). پیش تیمار فراصوت قبل از هیدرولیز آنزیمی می‌تواند باعث باز شدن ساختار پروتئین و افزایش شدت پروتئولیز از طریق افزایش در معرض قرارگیری باندهای پپتیدی مستعد به هیدرولیز آنزیمی گردد؛ این امر باعث افزایش کارایی در تولید پپتیدهای زیست‌فعال می‌گردد (Kadam *et al*,. 2018).

فرآیند فراصوت در طی هیدرولیز موجب کاهش وزن مولکولی همراه با در معرض قرارگیری مقادیر بالاتر اسیدهای آمینه آبگریزو

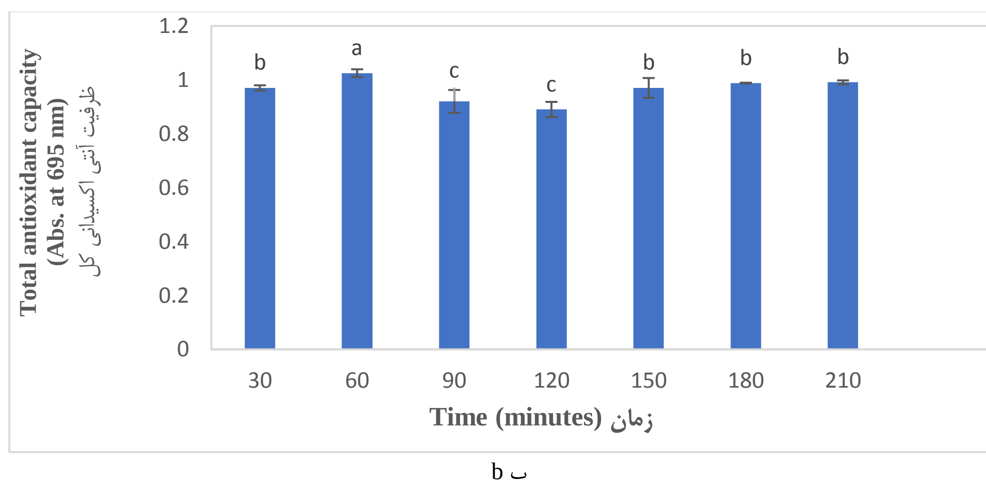
همچنین موجب تقویت برهمکنش پپتید با مولکول DPPH می‌گردد. مطالعه‌ی گورا آلموناسید و همکاران (Guerra-Almonacid *et al.*, 2019) نشان داد که پروتئین‌های هیدرولیز شده *erythrina edulis* تیمار شده با فراصوت نسبت به نمونه‌های تیمارنشده دارای بالاترین فعالیت‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS به‌ترتیب با مقادیر IC_{50} در محدوده ۱۵۱/۱۳ تا ۱۷۳/۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۶۴/۵۲ تا ۷۷/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند. همچنین گزارش شد، فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین‌های هیدرولیزشده گردو با تیمار فراصوت با توان ۸۰۰ وات (به‌مدت ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه)، ۱۲۰۰ وات (به‌مدت ۵، ۱۵، ۲۰، ۲۵، و ۳۰ دقیقه)، ۱۴۰۰ وات (به‌مدت ۵، ۱۰، و ۱۵ دقیقه)، و ۱۸۰۰ وات (به‌مدت ۲۰ دقیقه) بالاتر از نمونه شاهد بود. آن‌هاگزارش کردند که این نتایج ممکن است به‌دلیل تغییرات ساختاری در فراکسیون‌های ایزوله پروتئینی گردو پس از پیش‌تیمار فراصوت باشد که باعث می‌شود فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های آن متفاوت باشد. پیش‌تیمار فراصوت با شدت بالا می‌تواند محیط اطراف گروه‌های پروتئینی را تغییر داده، در نتیجه مکان‌های آبگریز ایزوله پروتئین گردو در معرض قرار می‌گیرند؛ که درنهایت این امر موجب افزایش سطح تماس بین آنزیم و سوبسترا شده و باعث بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده گردو می‌شود (Matmaroh *et al.*, 2011).

تأثیر زمان هیدرولیز و پیش‌تیمار فراصوت بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

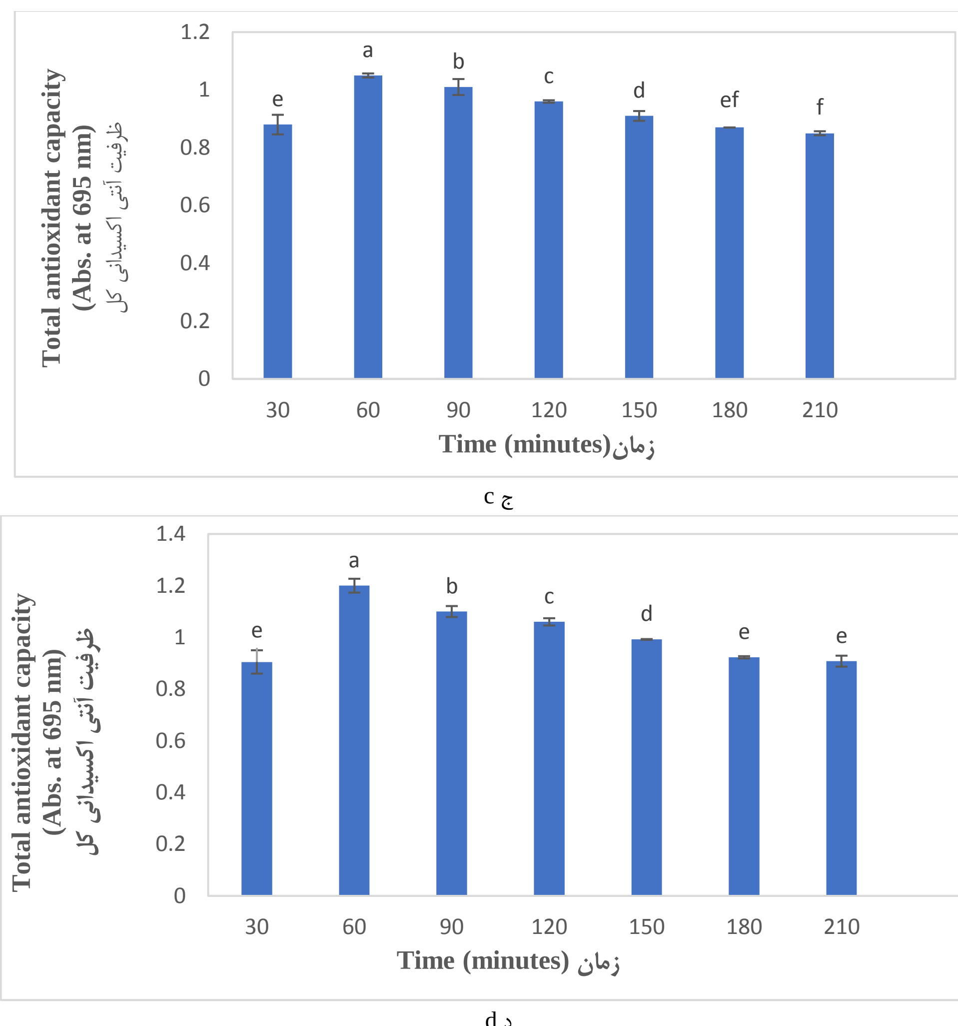
در شکل ۲ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار فراصوت (۱الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (۱ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (۱ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (۱د) تحت تاثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.



الف a



ب b



شکل ۲- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل درنمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار فراصوت (۱الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (۱ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (۱ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (۱د) در زمان‌های هیدرولیز مختلف

Figure 2- Total antioxidant capacity in hydrolyzed protein samples without ultrasound pretreatment (1a), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 40% power (1b), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 70% power (1c) and protein hydrolyzed by ultrasound treatment with 100% power (1d) at different hydrolysis times

با توجه به شکل ۲ الف بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمارنشده در زمان‌های هیدرولیز ۲۱۰ دقیقه به‌میزان ۰/۸۷ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده گردید. با افزایش زمان هیدرولیز ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل افزایش یافت، که دلیل این افزایش پیشرفت هیدرولیز و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌باشد. در واقع با افزایش زمان فعالیت آنزیم پپسین، آزاد سازی پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی افزایش یافته است. پیش‌تیمار فراصوت موجب می‌شود که در طول هیدرولیز، بخش‌های پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا به بخش‌هایی با وزن مولکولی نسبتاً کوچک با ظرفیت اهدای الکترون تجزیه شوند و بنابراین می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش داده و آن‌ها را به محصولاتی با ثبات‌تر تبدیل کنند، بنابراین موجب توقف واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون می‌گردند (Aderinola *et al.*, 2019).

در شکل ۲ ب، ج و د به‌ترتیب ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه های تیمارشده با فراصوت با توان‌های ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰٪ تحت تأثیر زمان هیدرولیز آورده شده است. بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه-های تیمارشده با فراصوت ۴۰٪ در زمان ۶۰ دقیقه به‌میزان ۱/۰۲ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه‌های تیمار نشده مشخص می‌شود که میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در زمان‌های هیدرولیز در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت ۴۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده است. به‌طوری‌که مقادیر آن برای نمونه‌های

بدون پیش‌تیمار فراصوت و نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ در زمان‌های ۶۰ و ۹۰ دقیقه به‌ترتیب (۰/۷۵ و ۰/۷۶) و (۱/۲۵ و ۰/۹۲) (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بود. این امر نشان از افزایش قابلیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های تیمار شده توسط فراصوت در زمان‌های هیدرولیزپایین‌تر بود. دلیل این امر این است که پیش‌تیمار فراصوت قبل از هیدرولیز آنزیمی می‌تواند باعث باز شدن ساختار پروتئین و افزایش شدت پروتئولیز از طریق افزایش در معرض قرارگیری باندهای پپتیدی مستعد به هیدرولیز آنزیمی گردد. همچنین بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمارنشده و تیمارشده توسط فراصوت با توان ۴۰٪ به‌ترتیب ۰/۸۷ و ۱/۰۲۵ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده شد که نشان از افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل تحت تأثیر تیمار فراصوت بود. با توجه به شکل ۲ج بالاترین میزان ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل درنمونه‌های تیمار شده با فراصوت ۷۰٪ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به‌میزان ۱/۰۵ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) و همچنین بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه های تیمارشده با فراصوت ۱۰۰٪ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به‌میزان ۱/۲ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده شد. با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، افزایش توان تیمار فراصوت باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در زمان‌های هیدرولیز کوتاه‌تر گردید. در اغلب زمان‌های هیدرولیز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمارنشده و تیمارشده با فراصوت باتوان ۴۰ و ۷۰٪ بود. فراصوت بواسطه اثرات مکانیکی، حفرگی، اثرات گرمایی، هم‌زدن دینامیکی، تنش‌برشی و اغتشاش باعث ایجاد یک سری تغییرات شیمیایی و فیزیکی در پروتئین می‌گردد؛ این اثرات موجب شکستن پیوندهای کووالانسی، تغییر ساختار پروتئین و تسریع فرآیند هیدرولیز آنزیمی و درنتیجه افزایش ترکیب آنزیم و پروتئین‌ها می‌گردد (Zhang *et al*., 2017; Ding *et al*., 2018).

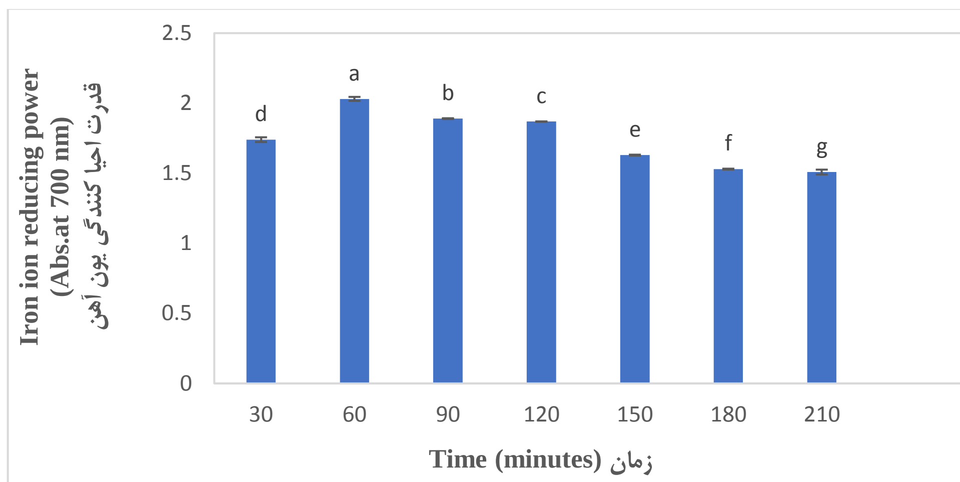
در بررسی زو و همکاران (Zou *et al*., 2019)، فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر پروتئین هیدرولیز شده مغز خوک تیمارشده با فراصوت نسبت به تیمارنشده نشان داده شد که مقادیر DPPH، ABTS، HRSA، Fe^{2+}-CA و قدرت احیا به‌ترتیب ۷۲، ۷۳، ۵۶، ۶۰ و ۰.۶۵ درصد بود. فراصوت موجب کاهش زمان هیدرولیز و افزایش آزادسازی پپتیدهای زیست‌فعال می‌شود و موجب افزایش فعالیت بازدارندگی ACE و قابلیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد، پیش‌تیمار فراصوت، اسیدآمینه های فعال را منتقل و در معرض قرار داده و در واکنش‌های اکسیداسیون دخالت می‌کند (Wali *et al*., 2017).

تأثیر زمان هیدرولیز و پیش‌تیمار فراصوت بر روی قدرت احیاءکنندگی یون آهن

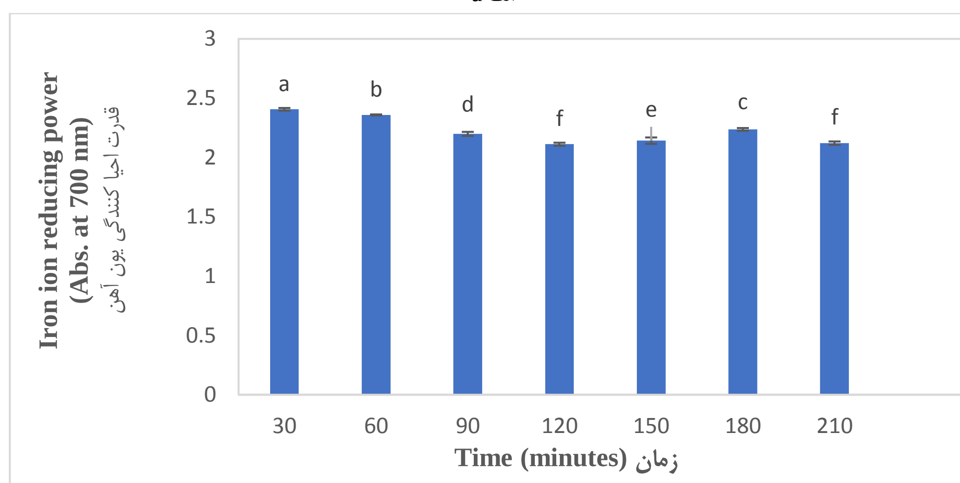
در شکل ۳ قدرت احیاءکنندگی یون آهن نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار فراصوت (۱الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (۱ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (۱ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (۱د) تحت تاثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

باتوجه به شکل ۳ الف بالاترین میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمارنشده در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۲/۰۳ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده گردید. با افزایش زمان هیدرولیز ابتدا قدرت احیاءکنندگی یون آهن افزایش و سپس کاهش یافت، که دلیل این افزایش پیشرفت هیدرولیز و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌باشد. احتمالا پیشرفت هیدرولیز و تاثیر آنزیم بر پپتیدهای تولید شده در مراحل اولیه منجر به تخریب پپتیدهایی با قدرت احیاءکنندگی یون آهن بالا شده است درنتیجه این قابلیت در مراحل بعدی کاهش یافته است. این یافته‌ها حاکی از تأثیر مثبت هیدرولیز با آنزیم پپسین بر افزایش قدرت احیاءکنندگی یون آهن پروتئین اولیه می‌باشد. به‌طور کلی افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به افزایش قابل توجه قدرت احیاکنندگی شد، این امر می‌تواند به دلایل مختلفی باشد از جمله این‌که، افزایش میزان هیدرولیز منجر به آزاد شدن آمینواسیدهای آزاد می‌گردد که به‌عنوان منبع اضافی از الکترون‌ها و پروتون‌ها عمل می‌کنند (Zhu *et al*., 2008).

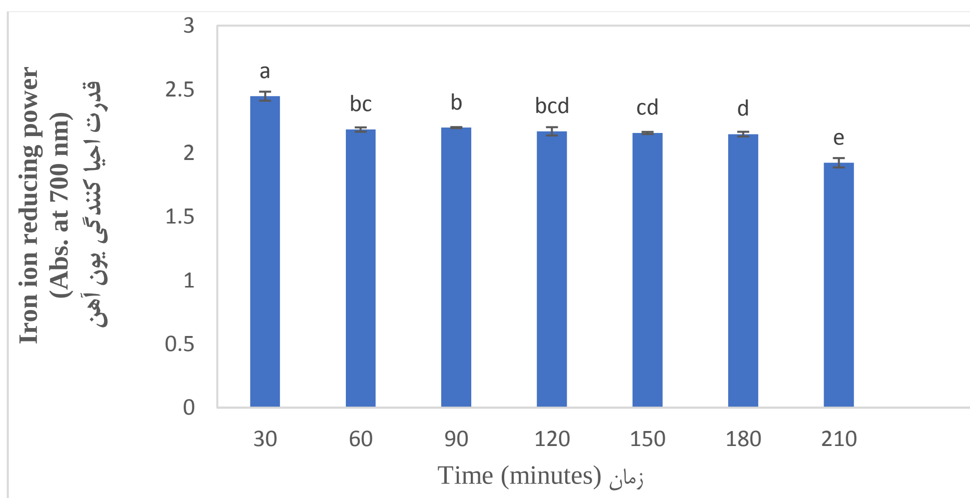
جی و همکاران (Je *et al*., 2009)، نشان دادند که هیدرولیز آنزیمی، سبب شکستن اتصالات مجاور اسیدهای‌آمینه فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان شده و به با شکسته شدن این پیوندهای پپتیدی و رها شدن آن‌ها از ساختار اصلی پروتئین‌ها، وزن‌مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدها کاهش می‌یابد. در ادامه افزایش زمان و پیشرفت فرآیند هیدرولیز منجر به شکسته شدن بیشتر زنجیره‌های پپتیدی شده و در نتیجه پپتیدهای با قابلیت الکترون دهی جهت احیاء یون آهن سه به یون آهن دو افزایش می‌یابند.


Iron ion reducing power
(Abs.at 700 nm)
قدرت احیا کنندگی یون آهن
2.5
2
1.5
1
0.5
0
d
a
b
c
e
f
g
30
60
90
120
150
180
210
Time (minutes) زمان

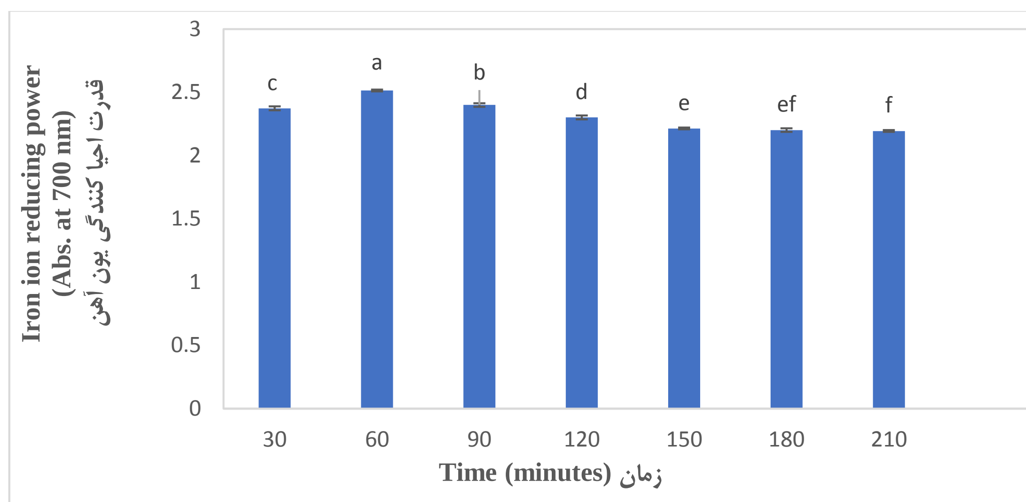
الف a


Iron ion reducing power
(Abs. at 700 nm)
قدرت احیا کنندگی یون آهن
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
a
b
d
f
e
c
f
30
60
90
120
150
180
210
Time (minutes) زمان

ب b


Iron ion reducing power
(Abs. at 700 nm)
قدرت احیا کنندگی یون آهن
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
a
bc
b
bcd
cd
d
e
30
60
90
120
150
180
210
Time (minutes) زمان

ج c



d د

شکل ۳- قدرت احیاءکنندگی یون آهن درنمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار فراصوت (۱الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ٤٠ درصد (۱ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (۱ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (۱د) در زمان‌های هیدرولیز مختلف

Figure 3- The reducing power of iron ion in hydrolyzed protein samples without ultrasound pretreatment (1a), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 40% power (1b), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 70% power (1c) and Protein hydrolyzed by ultrasound treatment with 100% power (1d) at different hydrolysis times

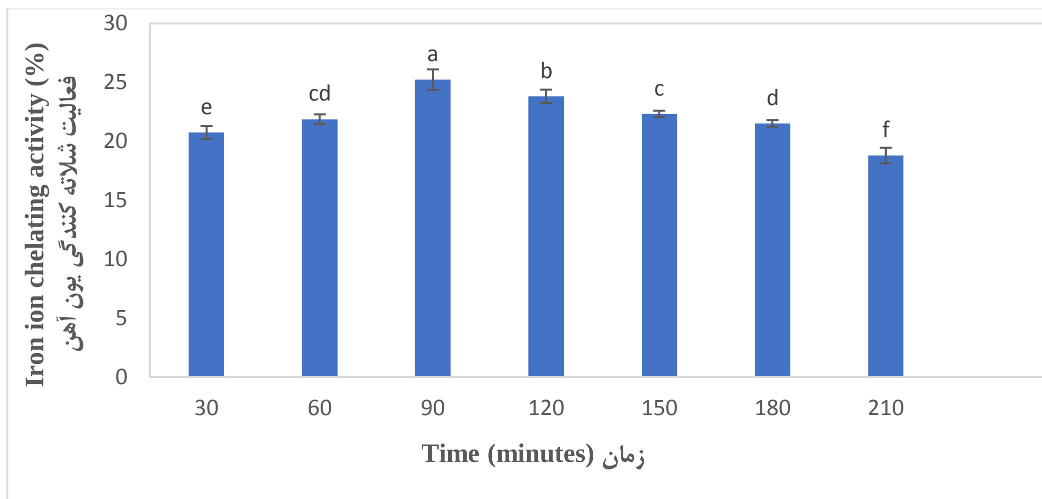
در شکل ۳ ب، ج و د به‌ترتیب قدرت احیاکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمارشده با فراصوت با توان‌های ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰٪ طی زمان هیدرولیز آورده شده است. بالاترین میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمارشده با فراصوت با توان۴۰٪ در زمان ۳۰ دقیقه به میزان ۲/۴۰ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه‌های تیمار نشده مشخص می‌شود که میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در تمام زمان‌های هیدرولیز در نمونه‌های تیمارشده با فراصوت با توان ۴۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمارنشده بود. همچنین بالاترین میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمارنشده و تیمارشده توسط فراصوت با توان ۴۰٪ به‌ترتیب ۲/۰۳ و ۲/۴۰ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده شد که نشان از افزایش قدرت احیاکنندگی یون آهن تحت تأثیر تیمار فراصوت بود.

با توجه به شکل ۳ ج بالاترین میزان قدرت احیاکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمارشده با فراصوت با توان ۷۰٪ در زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه به میزان ۲/۴۴ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) و همچنین بالاترین میزان قدرت احیاکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۲/۵۱ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده شد با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، مشخص می‌شود که با افزایش توان فراصوت در اغلب زمان‌های هیدرولیز، قدرت احیاءکنندگی یون آهن در تیمار فراصوت با توان۱۰۰ ٪ بالاتر از نمونه‌های تیمارنشده و تیمارشده با فراصوت ۴۰ و ۷۰٪ بود.

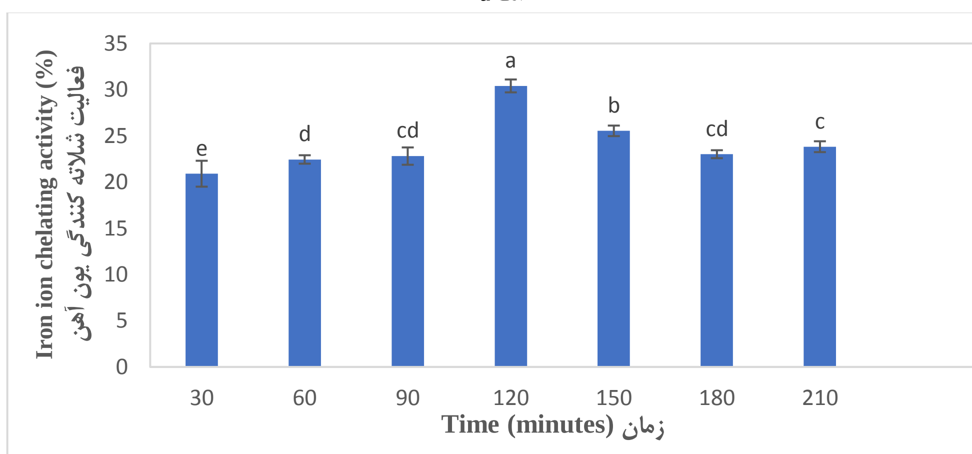
(Liang *et al.*, 2017)، گزارش کردند که پیش‌تیمار فراصوت پروتئین‌های بتا-کانگلایسینین وگلایسینین به‌طور قابل توجهی درجه هیدرولیز، گروه‌های SH آزاد و ظرفیت شلاته‌کنندگی یون آهن را در پروتئین‌های هیدرولیز شده افزایش داد. علاوه بر این، هضم آلکالاز به کمک پیش‌تیمار فراصوت به‌دلیل تشکیل پپتیدهای زنجیرکوتاه حاوی اسیدآمینه‌های آبگریز با وزن مولکولی بین ۲۰۰-۳۰۰۰ دالتون، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده ذرت را افزایش می‌دهد. مطالعات اخیر نشان داده است که پیش‌تیمار فراصوت می‌تواند آزادسازی پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از پروتئین بادام‌زمینی (Yu *et al.*, 2012) و گلوتن گندم (Zhu *et al.*, 2011) را تسهیل کند. به‌طور کلی افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به افزایش قابل توجه قدرت احیاکنندگی می‌شود که این امر می‌تواند به دلایل مختلفی باشد از جمله این‌که، افزایش درجه هیدرولیز منجر به در دسترس قرار گرفتن بیشتر اسیدآمینه‌های الکترون دهنده مانند لیزین، تریپتوفان و هیستیدین می گردد در نتیجه قدرت احیاءکنندگی افزایش می‌یابد. افزایش قدرت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده را به رها شدن اسیدهای‌آمینه با قابلیت آنتی‌اکسیدانی مانند لیزین و تریپتوفان نسبت داده‌اند (Jamdar *et al.*, 2010).

تأثیر زمان هیدرولیز و پیش‌تیمار فراصوت بر روی قدرت شلاته کنندگی یون‌آهن

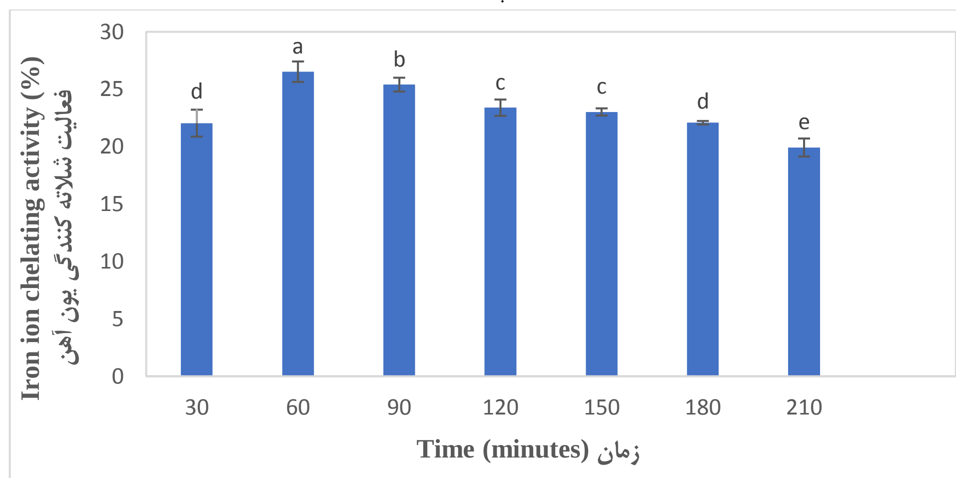
در شکل ۴ قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار فراصوت (۱الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (۱ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (۱ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (۱د) تحت تاثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.



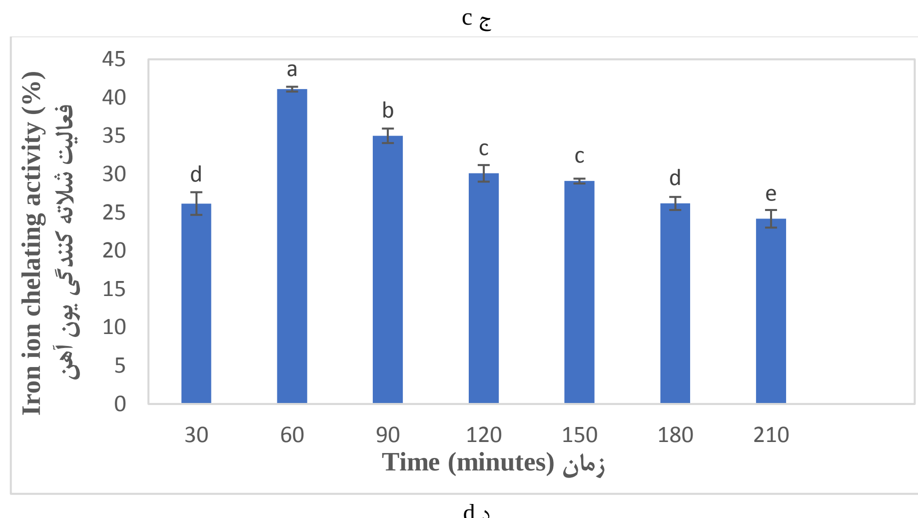
الف a



ب b



ج c



د d

شکل ٤- قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن درنمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار فراصوت (۱الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ٤٠ درصد (۱ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (۱ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (۱د) در زمان‌های هیدرولیز مختلف

Figure 4- Iron ion chelating power in hydrolyzed protein samples without ultrasound pretreatment (1a), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 40% power (1b), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 70% power (1c) and protein hydrolyzed by ultrasound treatment with 100% power (1d) at different hydrolysis times

باتوجه به شکل ۴ الف بالاترین میزان قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمارنشده در زمان هیدرولیز۹۰ دقیقه به میزان ۲۵/۲۲ (جذب در ۵۶۲ نانومتر) مشاهده گردید. با افزایش زمان هیدرولیز ابتدا قدرت احیاءکنندگی یون آهن افزایش و سپس کاهش یافت، که دلیل این افزایش پیشرفت هیدرولیز و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌باشد. این یافته‌ها حاکی از تأثیر مثبت هیدرولیز با آنزیم پپسین بر افزایش قدرت شلاته کنندگی یون‌آهن پروتئین اولیه می‌باشد. آنزیم پپسین منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان اسیدهای آمینه آبگریز مانند لوسین و اسیدهای آمینه آروماتیک مانند فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین با سایر اسیدهای آمینه می‌گردد (Sun *et al.*, 2011). ویژگی پروتئاز بر اندازه، مقدار، ترکیب اسید آمینه آزاد و پپتیدها و توالی اسیدآمینه آن‌ها تأثیر می‌گذارد که به نوبه خود بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌ها تأثیر می‌گذارد. ارزیابی درصد شلاته‌کنندگی نمونه‌ها نشان‌دهنده‌ی تاثیر قابل توجه زمان هیدرولیز بر فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بود. به‌طور کلی قابلیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده تحت تاثیر نوع آنزیم، میزان هیدرولیز و ساختار آمینواسیدی پروتئین اولیه قرار دارد (Nourmohammadi *et al.*, 2017). بنابراین، آنزیم پپسین توانسته پپتیدهایی با ترکیب آمینواسیدی مناسب و با قابلیت به‌دام‌اندازی یون آهن تولید کند. علاوه بر این موارد، پروتئین قارچ‌خوراکی غنی از لیزین، تریپتوفان و هیستیدین می‌باشد، پپتیدهای دارای توالی هیستیدین و تریپتوفان به‌دلیل دارا بودن حلقه‌ی ایمیدازول، توانایی شلاته‌کنندگی و به دام‌اندازی رادیکال‌های‌آزاد را دارند بنابراین احتمالا افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به تولید پپتیدهایی با این ترکیب شده و در نتیجه قدرت شلاته‌کنندگی یون‌آهن توسط آن‌ها افزایش یافته است. جمدار و همکاران (Jamdar *et al.*, 2010) و کلومپونگ و همکاران (Klompong *et al.*, 2007) نیز به‌ترتیب افزایش فعالیت شلاته کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی بادام زمینی و نوعی ماهی[1] را با افزایش درجه‌هیدرولیز گزارش کردند.

در شکل ۴ ب، ج و د به‌ترتیب قدرت شلاته کنندگی یون‌آهن در نمونه‌های تیمارشده با فراصوت با توان‌های۴۰، ۷۰ و ۱۰۰٪ طی زمان هیدرولیز آورده شده است. بالاترین میزان قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمارشده با فراصوت با توان۴۰٪ در زمان ۱۲۰ دقیقه به‌میزان ۳۰/۴۰ (جذب در ۵۶۲ نانومتر) مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه‌های تیمارنشده مشخص می‌شود که میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در تمام زمان‌های هیدرولیز در نمونه‌های تیمارشده با فراصوت با توان ۴۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمارنشده بود. همچنین بالاترین میزان قدرت شلاته‌کنندگی یون‌آهن در نمونه‌های تیمارنشده و تیمارشده توسط فراصوت با توان ۴۰٪ به‌ترتیب ۲۵/۲۲ و

1- *Selaroides leptolepis*

۳۰/۴۰ ٪ مشاهده شد که نشان از افزایش قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن تحت تأثیر تیمار فراصوت بود.

با توجه به شکل ۴ ج بالاترین میزان قدرت شلاته‌کنندگی یون‌آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۷۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۲۶/۵۲ ٪ و همچنین بالاترین میزان قدرت شلاته کنندگی یون‌آهن درنمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۴۱/۱۰ ٪ مشاهده شد با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، مشخص می‌شود که با افزایش توان فراصوت در اغلب زمان‌های هیدرولیز، قدرت شلاته کنندگی یون‌آهن در تیمار فراصوت با توان۱۰۰ ٪ بالاتر از نمونه‌های تیمارنشده و تیمارشده با فراصوت ۴۰ و ۷۰٪ بود. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که پیش‌تیمار فراصوت باعث شکستن برهمکنش‌های قوی بین‌مولکولی بین ماتریس–ماده حل شده، از جمله نیروهای واندروالسی و پیوندهای هیدروژنی می‌گردد (Ding *et al*., 2018). حفرگی صوتی موجب بهبود کیفیت انتقال بین آنزیم و سوبسترا می‌شود در نتیجه فراصوت می‌تواند باعث باز شدن ساختار پروتئین، کاهش اندازه پپتید و افزایش دسترسی آنزیم به پیوندهای پپتیدی گردد (Yang *et al*., 2017). آبادیا گارسیا و همکاران (Abadía-García *et al*., 2016)، نشان دادند که استفاده از توان بالای فراصوت موجب تغییر آرایش ساختار پروتئین و در نتیجه بهبود فرایند هیدرولیز آنزیمی می‌گردد، همچنین نشان دادند که پیش تیمار فراصوت باعث افزایش نرخ هیدرولیز می‌گردد. پژوهشگران گزارش کردند که پیش‌تیمار فراصوت پروتئین‌های بتا–کانگلایسینین و گلایسینین به‌طور قابل توجهی درجه هیدرولیز، گروه‌های SH آزاد و ظرفیت شلاته‌کنندگی یون آهن را در پروتئین‌های هیدرولیزشده ذرت افزایش داد، که دلیل آن افزایش نسبت‌های مارپیچ α و چرخش‌بتا، و کاهش در صفحه‌بتا و نسبت مارپیچ تصادفی دو بخش پروتئین پس از پیش‌تیمار فراصوت می‌باشد (Liang *et al*., 2017).

نتیجه‌گیری

امروزه به منظور پیشگیری از فساد غذاها و محافظت در مقابل بسیاری از بیماری‌ها ضروری است که از اکسیداسیون چربی‌ها و تشکیل رادیکال آزاد به وجود آمده در فرآورده غذایی و سلول‌های زنده جلوگیری شود. از جمله راه‌کارهای موجود استفاده از آنتی‌اکسیدان هاست. ازطرفی با توجه به گرایش مصرف‌کنندگان به‌سمت غذاهای فراسودمند و نگرانی‌هایی که در زمینه آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی وجود دارد، منجر به افزایش توجه پژهشگران به سمت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گشته است. پپتیدهای زیست فعال از طریق هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها تولید می‌شوند و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی هستند. روش معمول تولید این ترکیبات استفاده از هیدرولیزآنزیمی است اما فرآیندهای هیدرولیز آنزیمی دارای معایبی از جمله کارایی پایین آنزیم، زمان طولانی فرایند آنزیمی و نرخ پایین تبدیل سوبسترا به محصول می‌باشند. امروزه از روش‌های مختلف نظیرامواج فراصوت، مایکروویو، انجماد، فرایند فشار بالا، و غیره برای پیش‌تیمار پروتئین و رفع معایب فوق استفاده می‌شود. مکانیسم فراصوت به تأثیرات حرارتی، کاویتاسیون و کارایی مکانیکی آن نسبت داده می‌شود به‌طوری‌که می‌تواند باعث افزایش انتقال جرم و افزایش تماس بین سوبسترا و آنزیم یا تغییر در ساختار فضایی سوبسترا گردد. در این پژوهش تولید پروتئین هیدرولیز شده قارچ‌دکمه‌ای با استفاده از آنزیم پپسین با و بدون پیش‌تیمار فراصوت صورت گرفت. نتایج نشان داد که نمونه‌های پیش‌تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ نسبت به نمونه‌های بدون پیش‌تیمار و پیش تیمارشده با فراصوت با توان۴۰ و ۷۰٪ بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را دارا می‌باشند. براساس نتایج تیمار فراصوت با توان ۱۰۰٪ و طی زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه موجب دستیابی محصولی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالا می‌گردد و به‌عنوان تیمار مناسب انتخاب گردید. درنتیجه بر اساس این نتایج می‌توان بیان نمود که استفاده از پیش‌تیمار فراصوت با توان بالا موجب کوتاه نمودن زمان هیدرولیز جهت دستیابی به پپتیدهای با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر می‌گردد و در نتیجه موجب افزایش کارآیی هیدرولیز آنزیمی می‌گردد.

منابع

1. Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., Romero-Gómez, S., Ozuna, C., & Amaya-Llano, S.L. (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *37*, 84-90. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.010
2. Aderinola, T.A., Fagbemi, T.N., Enujiugha, V.N., Alashi, A.M., & Aluko, R.E. (2019). In vitro antihypertensive and antioxidative properties of alcalase-derived *Moringa oleifera* seed globulin hydrolysate and its membrane fractions. *Journal of Food Processing and Preservation*, *43*(2), e13862. https://doi.org/10.1111/jfpp.13862
3. Bhat, Z.F., Kumar, S., & Bhat, H.F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(9), 5377-5392. https://doi.org/10.1007/s13197-015-1731-5
4. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, *114*(4), 1198-1205. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.075

5. Chen, L., Chen, J., Ren, J., & Zhao, M. (2011). Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(6), 2600-2609. https://doi.org/10.1021/jf103771x
6. Chi, C.F., Hu, F.Y., Wang, B., Li, T., & Ding, G.F. (2015). Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*, *15*, 301-313. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.045
7. Dasgupta, N., & De, B. (2007). Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chemistry*, *101*(2), 471-474. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.003
8. Ding, Q., Zhang, T., Niu, S., Cao, F., Wu-Chen, R.A., Luo, L., & Ma, H. (2018). Impact of ultrasound pretreatment on hydrolysate and digestion products of grape seed protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, *42*, 704-713. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.11.027
9. FitzGerald, R.J., & Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, *84*(S1), 33-37. https://doi.org/10.1017/S0007114500002221
10. Guerra-Almonacid, C.M., Torruco-Uco, J.G., Murillo-Arango, W., Méndez-Arteaga, J.J., & Rodríguez-Miranda, J. (2019). Effect of ultrasound pretreatment on the antioxidant capacity and antihypertensive activity of bioactive peptides obtained from the protein hydrolysates of *Erythrina edulis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 288-296. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104787
11. He, J. Z., Ru, Q.M., Dong, D.D., & Sun, P.L. (2012). Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. *Molecules*, *17*(4), 4373-4387. https://doi.org/10.3390/molecules17044373
12. Horwitz, W., Chichilo, P., & Reynolds, H. (1970). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.
13. Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A.(2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, *121*(1), 178-184. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.027
14. Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H., & Ahn, C.B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, *42*(9), 1266-1272. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.06.013
15. Kadam, S.U., Tiwari, B.K., Álvarez, C., & O'Donnell, C.P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, *46*(1), 60-67. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.012
16. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, *102*(4), 1317-1327. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016
17. Lavi, I., Nimri, L., Levinson, D., Peri, I., Hadar, Y., & Schwartz, B. (2012). Glucans from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* inhibit colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Journal of Gastroenterology*, *47*(5), 504-518. https://doi.org/10.1007/s00535-011-0514-7
18. Li, X.R., Chi, C.F., Li, L., & Wang, B. (2017). Purification and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of scalloped hammerhead (*Sphyrna lewini*) cartilage. *Marine Drugs*, *15*(3), 61. https://doi.org/10.3390/md15030061
19. Liang, Q., Ren, X., Ma, H., Li, S., Xu, K., & Oladejo, A.O. (2017). Effect of low-frequency ultrasonic-assisted enzymolysis on the physicochemical and antioxidant properties of corn protein hydrolysates. *Journal of Food Quality*, *2017*. https://doi.org/10.1155/2017/2784146
20. Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A.B., & Kishimura, H. (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*, *129*(3), 1179-1186. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.099
21. Meshginfar, N., Sadeghi, M.A., Ziaiifar, A.M., Ghorbani, M., & Kashaninejad, M. (2014). Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology. *Journal of Food Research*, *24*(2), 215-225.
22. Nourmohammadi, E., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Alami, M., & Sadeghi, M. (2017). The optimization of the production of anti-oxidative peptides from enzymatic hydrolysis of Pumpkin seed protein. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *13*(1), 14-26. https://doi.org/10.22067/ifstrj.v1395i0.45423
23. Nadeem, M., Ubaid, N., Qureshi, T.M., Munir, M., & Mehmood, A. (2018). Effect of ultrasound and chemical treatment on total phenol, flavonoids and antioxidant properties on carrot-grape juice blend during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, *45*, 1-6. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.034

24. Paisansak, S., Sangtanoo, P., Srimongkol, P., Saisavoey, T., Reamtong, O., Choowongkomon, K., & Karnchanata, A. (2020). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide derived from the shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). *Journal Food Science and Technology*, *58*(1), 85–97. https://doi.org/ 10.1007/s13197-020-04517-z
25. Pan, X., Zhao, Y.Q., Hu, F.Y., & Wang, B. (2016). Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) cartilage. *Journal of Functional Foods*, *25*, 220-230. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.008
26. Sun, Q., Shen, H., & Luo, Y. (2011). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *Journal of Food Science and Technology*, *21*, 6646-6652. https://doi.org/10.1007/s13197-010-0115-0
27. Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M.D.M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*, *52*(2), 132-136. https://doi.org/10.3989/gya.2001.v52.i2.385
28. Wali, A., Ma, H., Shahnawaz, M., Hayat, K., Xiaong, J., & Jing, L. (2017). Impact of power ultrasound on antihypertensive activity, functional properties, and thermal stability of rapeseed protein hydrolysates. *Journal of Chemistry*, *2017*. https://doi.org/10.1155/2017/4373859
29. Walters, M.E. (2019). *Effects of Ultrasonication on the Antioxidant and Anti-diabetic Properties of Hydrolyzed Oat Proteins* (Doctoral dissertation, Carleton University). https://doi.org/10.22215/etd/2019-13844
30. Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., et al. (2018a). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops-A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *48*, 538–549. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018
31. Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Wang, Y., Huang, S., ... & Ye, X. (2017). Effects of low power density multi-frequency ultrasound pretreatment on the enzymolysis and the structure characterization of defatted wheat germ protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, *38*, 410-420. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.001
32. Yu, L., Sun, J., Liu, S., Bi, J., Zhang, C., & Yang, Q. (2012). Ultrasonic-assisted enzymolysis to improve the antioxidant activities of peanut (*Arachin conarachin* L.) antioxidant hydrolysate. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(7), 9051-9068. https://doi.org/10.3390/ijms13079051
33. Zhang, Y., Ma, L., Cai, L., Liu, Y., & Li, J. (2017). Effect of combined ultrasonic and alkali pretreatment on enzymatic preparation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from native collagenous materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, *36*, 88-94. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.11.008
34. Zhou, C., Hu, J., Yu, X., Yagoub, A.E.A., Zhang, Y., Ma, H., ... & Otu, P.N.Y. (2017). Heat and/or ultrasound pretreatments motivated enzymolysis of corn gluten meal: Hydrolysis kinetics and protein structure. *LWT*, *77*, 488-496. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.048
35. Zhu, K.X., Su, C.Y., Guo, X.N., Peng, W., & Zhou, H.M. (2011). Influence of ultrasound during wheat gluten hydrolysis on the antioxidant activities of the resulting hydrolysate. *International Journal of Food Science & Technology*, *46*(5), 1053-1059. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02585.x
36. Zhu, L., Chen, J., Tang, X., & Xiong, Y.L. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(8), 2714-2721. https://doi.org/10.1021/jf703697e
37. Zou, Y., Yang, H., Li, P.P., Zhang, M. H., Zhang, X.X., Xu, W.M., & Wang, D.Y. (2019). Effect of different time of ultrasound treatment on physicochemical, thermal, and antioxidant properties of chicken plasma protein. *Poultry Science*, *98*(4), 1925-1933. https://doi.org/10.3382/ps/pey502